

IB/04/00885



Ministero delle Attività Produttive

Direzione Generale per lo Sviluppo Produttivo e la Competitività

Ufficio Italiano Brevetti e Marchi

Ufficio G2

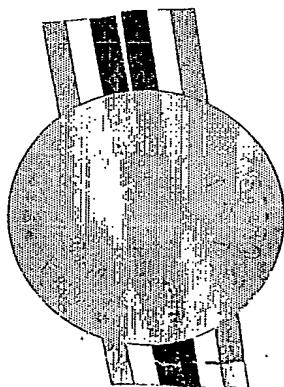


Autenticazione di copia di documenti relativi alla domanda di brevetto per: P.C.T.
N. PCT/IT03/00193 del 01.04.2003 ✓

Si dichiara che l'unità copia è conforme ai documenti originali depositati con la domanda di brevetto sopra specificata, i cui dati risultano dall'accluso processo verbale di deposito.

24 GEN. 2005

Roma, li.....



IL FUNZIONARIO
IL DIRIGENTE
Dr. A. CAPONE

Angel Cap

**PRIORITY
DOCUMENT**

SUBMITTED OR TRANSMITTED
BUT NOT IN COMPLIANCE WITH
RULE 17.1(a) OR (b)

BEST AVAILABLE COPY

PCT**REQUEST**

The undersigned requests that the present international application be processed according to the Patent Cooperation Treaty.

HOME COPY

For receiving Office use only

PCT/IT03/00193

International Application No.

01 APR 2003

International Filing Date

MINISTERO DELLE ATTIVITA' PRODUTTIVE
 Ufficio Italiano per le brevetti e la proprietà intellettuale
 UFFICIO ITALIANO BREVETTI E MARCHI
 Name of receiving Office and "PCT International Application"

Applicant's or agent's file reference:
 (if desired) (12 characters maximum) **P0213.12WO.1**

Box No. I **TITLE OF INVENTION****USE OF BACTERIOCIN FOR THE AMELIORATION OF DIGESTIVE FUNCTIONALITY**Box No. II **APPLICANT** This person is also inventor

Name and address: (Family name followed by given name; for a legal entity, full official designation. The address must include postal code and name of country. The country of the address indicated in this box is the applicant's State (that is, country) of residence if no State of residence is indicated below.)

PIVA Andrea
 Via Carbonesi 7
 40123 BOLOGNA
 ITALY

Telephone No.

Facsimile No.

Teleprinter No.

Applicant's registration No. with the Office

State (that is, country) of nationality:
ITALYState (that is, country) of residence:
ITALYThis person is applicant
for the purposes of: all designated

States

 all designated States except

the United States of America

 the United States
of America only the States indicated in
the Supplemental BoxBox No. III **FURTHER APPLICANT(S) AND/OR (FURTHER) INVENTOR(S)**

Name and address: (Family name followed by given name; for a legal entity, full official designation. The address must include postal code and name of country. The country of the address indicated in this box is the applicant's State (that is, country) of residence if no State of residence is indicated below.)

CASADEI Gabriele
 Via Donati 158
 47020 CESENA
 ITALY

This person is:

 applicant only applicant and inventor inventor only (If this check-box
is marked, do not fill in below.)

Applicant's registration No. with the Office

State (that is, country) of nationality:
ITALYState (that is, country) of residence:
ITALYThis person is applicant
for the purposes of: all designated

States

 all designated States except

the United States of America

 the United States
of America only the States indicated in
the Supplemental Box Further applicants and/or (further) inventors are indicated on a continuation sheet.Box No. IV **AGENT OR COMMON REPRESENTATIVE; OR ADDRESS FOR CORRESPONDENCE**The person identified below is hereby/has been appointed to act on behalf
of the applicant(s) before the competent International Authorities as:

agent

 common
representative

Name and address: (Family name followed by given name; for a legal entity, full official designation. The address must include postal code and name of country.)

TANSINI Elio Fabrizio
 BUGNION S.P.A.
 Viale Lancetti 17
 20158 MILANO
 ITALY

Telephone No.

0039-02-693031

Facsimile No.

0039-02-69303501

Teleprinter No.

Agent's registration No. with the Office
EPI Reg. No. 89350

Address for correspondence; Mark this check-box where no agent or common representative is/has been appointed and the space above is used instead to indicate a special address to which correspondence should be sent.

Sheet No. ... 2 ...

Box No. V DESIGNATION OF STATES

Mark the applicable check-boxes below; at least one must be marked.

The following designations are hereby made under Rule 4.9(a):

Regional Patent

AP ARIPO Patent: GH Ghana, GM Gambia, KE Kenya, LS Lesotho, MW Malawi, MZ Mozambique, SD Sudan, SL Sierra Leone, SZ Swaziland, TZ United Republic of Tanzania, UG Uganda, ZM Zambia, ZW Zimbabwe, and any other State which is a Contracting State of the Harare Protocol and of the PCT (if other kind of protection or treatment desired, specify on dotted line)

EA Eurasian Patent: AM Armenia, AZ Azerbaijan, BY Belarus, KG Kyrgyzstan, KZ Kazakhstan, MD Republic of Moldova, RU Russian Federation, TJ Tajikistan, TM Turkmenistan, and any other State which is a Contracting State of the Eurasian Patent Convention and of the PCT

EP European Patent: AT Austria, BE Belgium, BG Bulgaria, CH & LI Switzerland and Liechtenstein, CY Cyprus, CZ Czech Republic, DE Germany, DK Denmark, EE Estonia, ES Spain, FI Finland, FR France, GB United Kingdom, GR Greece, IE Ireland, IT Italy, LU Luxembourg, MC Monaco, NL Netherlands, PT Portugal, SE Sweden, SI Slovenia, SK Slovakia, TR Turkey, and any other State which is a Contracting State of the European Patent Convention and of the PCT

OA OAPI Patent: BF Burkina Faso, BJ Benin, CF Central African Republic, CG Congo, CI Côte d'Ivoire, CM Cameroon, GA Gabon, GN Guinea, GQ Equatorial Guinea, GW Guinea-Bissau, ML Mali, MR Mauritania, NE Niger, SN Senegal, TD Chad, TG Togo, and any other State which is a member State of OAPI and a Contracting State of the PCT (if other kind of protection or treatment desired, specify on dotted line)

National Patent (if other kind of protection or treatment desired, specify on dotted line):

<input checked="" type="checkbox"/> AE United Arab Emirates	<input checked="" type="checkbox"/> GM Gambia	<input checked="" type="checkbox"/> NZ New Zealand
<input checked="" type="checkbox"/> AG Antigua and Barbuda	<input checked="" type="checkbox"/> HR Croatia	<input checked="" type="checkbox"/> OM Oman
<input checked="" type="checkbox"/> AL Albania	<input checked="" type="checkbox"/> HU Hungary	<input checked="" type="checkbox"/> PH Philippines
<input checked="" type="checkbox"/> AM Armenia	<input checked="" type="checkbox"/> ID Indonesia	<input checked="" type="checkbox"/> PL Poland
<input checked="" type="checkbox"/> AT Austria	<input checked="" type="checkbox"/> IL Israel	<input checked="" type="checkbox"/> PT Portugal
<input checked="" type="checkbox"/> AU Australia	<input checked="" type="checkbox"/> IN India	<input checked="" type="checkbox"/> RO Romania
<input checked="" type="checkbox"/> AZ Azerbaijan	<input checked="" type="checkbox"/> IS Iceland	<input checked="" type="checkbox"/> RU Russian Federation
<input checked="" type="checkbox"/> BA Bosnia and Herzegovina	<input checked="" type="checkbox"/> JP Japan	<input checked="" type="checkbox"/> SC Seychelles
<input checked="" type="checkbox"/> BB Barbados	<input checked="" type="checkbox"/> KE Kenya	<input checked="" type="checkbox"/> SD Sudan
<input checked="" type="checkbox"/> BG Bulgaria	<input checked="" type="checkbox"/> KG Kyrgyzstan	<input checked="" type="checkbox"/> SE Sweden
<input checked="" type="checkbox"/> BR Brazil	<input checked="" type="checkbox"/> KP Democratic People's Republic of Korea	<input checked="" type="checkbox"/> SG Singapore
<input checked="" type="checkbox"/> BY Belarus	<input checked="" type="checkbox"/> KR Republic of Korea	<input checked="" type="checkbox"/> SK Slovakia
<input checked="" type="checkbox"/> BZ Belize	<input checked="" type="checkbox"/> KZ Kazakhstan	<input checked="" type="checkbox"/> SL Sierra Leone
<input checked="" type="checkbox"/> CA Canada	<input checked="" type="checkbox"/> LC Saint Lucia	<input checked="" type="checkbox"/> TJ Tajikistan
<input checked="" type="checkbox"/> CH & LI Switzerland and Liechtenstein	<input checked="" type="checkbox"/> LK Sri Lanka	<input checked="" type="checkbox"/> TM Turkmenistan
<input checked="" type="checkbox"/> CN China	<input checked="" type="checkbox"/> LR Liberia	<input checked="" type="checkbox"/> TN Tunisia
<input checked="" type="checkbox"/> CO Colombia	<input checked="" type="checkbox"/> LS Lesotho	<input checked="" type="checkbox"/> TR Turkey
<input checked="" type="checkbox"/> CR Costa Rica	<input checked="" type="checkbox"/> LT Lithuania	<input checked="" type="checkbox"/> TT Trinidad and Tobago
<input checked="" type="checkbox"/> CU Cuba	<input checked="" type="checkbox"/> LU Luxembourg	<input checked="" type="checkbox"/> TZ United Republic of Tanzania
<input checked="" type="checkbox"/> CZ Czech Republic	<input checked="" type="checkbox"/> LV Latvia	<input checked="" type="checkbox"/> UA Ukraine
<input checked="" type="checkbox"/> DE Germany	<input checked="" type="checkbox"/> MA Morocco	<input checked="" type="checkbox"/> UG Uganda
<input checked="" type="checkbox"/> DK Denmark	<input checked="" type="checkbox"/> MD Republic of Moldova	<input checked="" type="checkbox"/> US United States of America
<input checked="" type="checkbox"/> DM Dominica	<input checked="" type="checkbox"/> MG Madagascar	<input checked="" type="checkbox"/> UZ Uzbekistan
<input checked="" type="checkbox"/> DZ Algeria	<input checked="" type="checkbox"/> MK The former Yugoslav Republic of Macedonia	<input checked="" type="checkbox"/> VC Saint Vincent and the Grenadines
<input checked="" type="checkbox"/> EC Ecuador	<input checked="" type="checkbox"/> MN Mongolia	<input checked="" type="checkbox"/> VN Viet Nam
<input checked="" type="checkbox"/> EE Estonia	<input checked="" type="checkbox"/> MW Malawi	<input checked="" type="checkbox"/> YU Yugoslavia
<input checked="" type="checkbox"/> ES Spain	<input checked="" type="checkbox"/> MX Mexico	<input checked="" type="checkbox"/> ZA South Africa
<input checked="" type="checkbox"/> FI Finland	<input checked="" type="checkbox"/> MZ Mozambique	<input checked="" type="checkbox"/> ZM Zambia
<input checked="" type="checkbox"/> GB United Kingdom	<input checked="" type="checkbox"/> NO Norway	<input checked="" type="checkbox"/> ZW Zimbabwe
<input checked="" type="checkbox"/> GD Grenada		
<input checked="" type="checkbox"/> GE Georgia		
<input checked="" type="checkbox"/> GH Ghana		

Check-boxes below reserved for designating States which have become party to the PCT after issuance of this sheet:

NI NICARAGUA

.....

.....

Precautionary Designation Statement: In addition to the designations made above, the applicant also makes under Rule 4.9(b) all other designations which would be permitted under the PCT except any designation(s) indicated in the Supplemental Box as being excluded from the scope of this statement. The applicant declares that those additional designations are subject to confirmation and that any designation which is not confirmed before the expiration of 15 months from the priority date is to be regarded as withdrawn by the applicant at the expiration of that time limit. (Confirmation (including fees) must reach the receiving Office within the 15-month time limit.)

Sheet No. 3

Box No. VI PRIORITY CLAIM

The priority of the following earlier application(s) is hereby claimed:

Filing date of earlier application (day/month/year)	Number of earlier application	Where earlier application is:		
		national application; country or Member of WTO	regional application; regional Office	international application; receiving Office
item (1)				
item (2)				
item (3)				
item (4)				
item (5)				

Further priority claims are indicated in the Supplemental Box.

The receiving Office is requested to prepare and transmit to the International Bureau a certified copy of the earlier application(s) (only if the earlier application was filed with the Office which for the purposes of this International application is the receiving Office) identified above as:

all items item (1) item (2) item (3) item (4) item (5) other, see
Supplemental Box

* Where the earlier application is an ARIPO application, indicate at least one country party to the Paris Convention for the Protection of Industrial Property or one Member of the World Trade Organization for which that earlier application was filed (Rule 4.10(b)(ii)). . .

Box No. VII INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY

Choice of International Searching Authority (ISA) (if two or more International Searching Authorities are competent to carry out the international search, indicate the Authority chosen; the two-letter code may be used):

ISA / _____

Requester Name: Mr. John Doe

Request to use results of earlier search; reference to that search (if an earlier search has been carried out by or requested from the International Searcher).

Box No. VIII DECLARATIONS

The following declarations are contained in Boxes Nos. VIII (i) to (v) (mark the applicable check-boxes below and indicate in the right column the number of each type of declaration):

Number of declarations

- Box No. VIII (i) Declaration as to the identity of the inventor
- Box No. VIII (ii) Declaration as to the applicant's entitlement, as at the international filing date, to apply for and be granted a patent
- Box No. VIII (iii) Declaration as to the applicant's entitlement, as at the international filing date, to claim the priority of the earlier application
- Box No. VIII (iv) Declaration of inventorship (only for the purposes of the designation of the United States of America)
- Box No. VIII (v) Declaration as to non-prejudicial disclosures or exceptions to lack of novelty

Sheet No. 4

Box No. IX CHECK LIST; LANGUAGE OF FILING

This international application contains:

(a) in paper form, the following number of sheets:

request (including declaration sheets)	:	4
description (excluding sequence listings and/or tables related thereto)	:	22
claims	:	2
abstract	:	1
drawings	:	4
Sub-total number of sheets	:	33
sequence listings	:	
tables related thereto	:	
(for both, actual number of sheets if filed in paper form, whether or not also filed in computer readable form; see (c) below)	:	
Total number of sheets	:	33

(b) only in computer readable form (Section 801(a)(i))
 (i) sequence listings
 (ii) tables related thereto

(c) also in computer readable form (Section 801(a)(ii))
 (i) sequence listings
 (ii) tables related thereto

Type and number of carriers (diskette, CD-ROM, CD-R or other) on which are contained the

sequence listings:
 tables related thereto:
 (additional copies to be indicated under items 9(ii) and/or 10(iv), in right column)

Figure of the drawings which should accompany the abstract: Fig. A

Language of filing of the international application:

ITALIAN

Box No. X SIGNATURE OF APPLICANT, AGENT OR COMMON REPRESENTATIVE

Next to each signature, indicate the name of the person signing and the capacity in which the person signs (if such capacity is not obvious from reading the request).

TANSINI Elio Fabrizio
Applicant's Agent

For receiving Office use only	
1. Date of actual receipt of the purported international application:	01 APR 2003 01/04/03
3. Corrected date of actual receipt due to later but timely received papers or drawings completing the purported international application:	
4. Date of timely receipt of the required corrections under PCT Article 11(2):	
5. International Searching Authority (if two or more are competent): ISA /	6. <input type="checkbox"/> Transmittal of search copy delayed until search fee is paid
For International Bureau use only	
Date of receipt of the record copy by the International Bureau:	

2. Drawings:

 received: not received:

For International Bureau use only	
Date of receipt of the record copy by the International Bureau:	

IMPIEGO DI BATTERIOCINE PER IL MIGLIORAMENTO DELLA FUNZIONALITA' DIGESTIVA

CAMPO TECNICO

La presente invenzione ha per oggetto l'impiego di batteriocine e/o dei loro ceppi produttori per il miglioramento della funzionalità digestiva e per il miglioramento delle condizioni del tratto gastrico intestinale nelle specie di organismi monogastriche.

STATO DELLA TECNICA

Sono noti i batteri appartenenti al genere *Pediococcus*. I batteri appartenenti al genere *Pediococcus* sono omofermentanti, anaerobi facoltativi non incapsulati. I batteri appartenenti al genere *Pediococcus* sono chemoorganotrofi e, pertanto, hanno fabbisogni nutrizionali complessi, non hanno attività proteolitica e sono saprofagi di molti vegetali freschi ed in fermentazione. La loro importanza economica nella trasformazione e conservazione di prodotti vegetali, della carne ed il loro contributo nello sviluppo degli aromi dei formaggi, ne fa un genere particolarmente attraente dal punto di vista industriale. I batteri appartenenti al genere *Pediococcus* sono stati isolati dal rumine di bovine da latte e dai ciechi di pulcini. Possono essere identificate otto specie in funzione della loro sensibilità alla temperatura, al pH e NaCl.

La specie *P. cerevisiae* è stata cancellata ed i ceppi precedentemente così indicati sono confluiti in parte nella specie *P. damnosus* ed in parte nella specie *P. pentosaceus*. I batteri appartenenti a quest'ultima categoria, hanno il loro habitat naturale nei vegetali e presentano temperature di sviluppo inferiori ai 50°C (per *P. pentosaceus* FBB61, l'optimum è stabilito a 35°C), al contrario dei pediococchi termofili che sviluppano bene a 50°C, hanno dimensioni cellulari



più piccole (0,5-0,8 μ m) e sono raggruppati nella specie *P. acidilactici*.

E' noto che una delle caratteristiche dei batteri lattici che li rende particolarmente interessanti per un possibile uso probiotico, è la loro capacità di competere con altri batteri per la stessa nicchia ecologica e di prevalere. Questa 5 abilità è imputabile alla produzione di elevate concentrazioni di acidi organici e prodotti secondari del metabolismo, coadiuvati da sostanze ad azione antimicrobica di natura proteica, indicate con il termine "batteriocine".

E' noto che il microorganismo *Pediococcus pentosaceus* FBB61 è responsabile della produzione di una sostanza antimicrobica di natura proteica (batteriocina) 10 definita pediocina A.

E' noto che la capacità dei batteri lattici di competere con altri batteri per la stessa nicchia ecologica e prevalere, oltre ad essere dovuta alla produzione di acidi organici ed alla tolleranza a bassi livelli di pH, è talvolta potenziata dalla produzione di sostanze antimicrobiche di natura proteica. E' ampiamente 15 riconosciuto che queste proteine o peptidi ad azione antimicrobica, indicati con il termine di "batteriocine", contribuiscono in modo determinante alla sopravvivenza o dominanza di certi ceppi batterici in ecosistemi micobici quali gli alimenti o il tratto digerente.

Esempi di produzioni di batteriocine sono presenti in tutte le specie batteriche 20 conosciute e in genere hanno azione antagonista solo contro quelle specie che occupano la medesima nicchia ecologica o quelle filogeneticamente vicine al microrganismo produttore. Fanno eccezione a questa regola generale i peptidi contenenti lantionina, come la nisinina e la subtilina, che mostrano un'attività antimicrobica contro i Gram + in generale.

25 La lunghissima e positiva storia di impiego di questi batteri risiede

verosimilmente nella produzione di queste batteriocine finora studiate allo scopo di allungare la conservabilità degli alimenti e migliorarne le caratteristiche igieniche in relazione allo sviluppo di microrganismi patogeni.

Pertanto risulta che le batteriocine sono finora state studiate, prodotte e purificate per un loro possibile utilizzo quali conservanti di prodotti finiti e/o materie prime, in virtù delle loro spiccate capacità antimicrobiche nei confronti di microrganismi depauperanti e/o nocivi.

Tuttavia, ad oggi non risulta essere stato indagato l'impiego di Batteriocine come modulatori dell'ambiente intestinale e come miglioratori delle condizioni igienico-sanitarie dell'intestino.

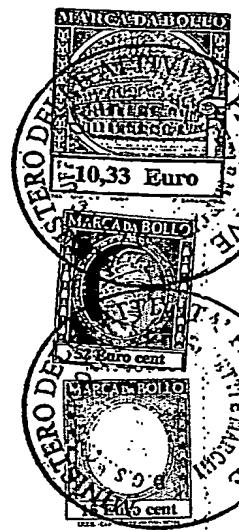
DESCRIZIONE DELL'INVENZIONE

La presente invenzione riguarda l'utilizzo innovativo di batteriocine e/o dei loro ceppi produttori come miglioratori delle condizioni del tratto gastro intestinale le specie di organismi monogastriche ivi compresi: uomo, suini, conigli, cavalli, pollame anche selvatico, ovini, caprini, felidi, canidi e ruminanti non funzionali.

L'aggiunta di una batteriocina o del suo batterio produttore, un batterio lattico, nella fattispecie pediocina A e *Pediococcus pentosaceus* FBB61, *Pediococcus pentosaceus* FBB63 e le sue batteriocine, *Pediococcus pentosaceus* L 7230 e le sue batteriocine, alla dieta produce effetti positivi sull'organismo grazie ad un migliore assetto generale del tratto gastrointestinale.

Batteri lattici, compresi lattobacilli e bifidobatteri, considerati GRAS (Generally Recognised as Safe) introdotti nella dieta e/o somministrati all'organismo, portano alla produzione all'interno dell'apparato gastrointestinale di acido lattico che determina una riduzione del pH intestinale. Questo basso pH risulta inospitale per molti microrganismi indesiderati (inclusi patogeni umani ed

animali) che non possono sopravvivere in condizioni cosi' acide. Di conseguenza l'invenzione sviluppa un miglior equilibrio microbico intestinale. La colonizzazione di questi batteri è favorita dalla produzione di molecole proteiche antimicrobiche dette batteriocine che avendo attivita' propria, possono altresi' agire e quindi essere impiegate in qualsiasi forma anche da sole, senza la presenza obbligatoria del ceppo produttore. Un ulteriore vantaggio dell'invenzione deriva dalla riduzione della produzione di composti oncogenici dovuta alla proliferazione di batteri benefici, siano essi i ceppi produttori di batteriocine medesimi o altri ceppi batterici benefici non intaccati dall'azione antimicrobica delle proteine antimicrobiche. Come dimostrato nei sistemi di fermentazione in vitro tali effetti si evidenziano nella riduzione della produzione di cresolo, un metabolita della tiroxina, considerato responsabile dell'insorgenza di tumori cutanei ed epatici nel topo, nonche' un fattore deprimente la crescita animale ad esempio nel suino. Inoltre sempre nei sistemi in vitro, la presenza di batteriocine e/o dei loro ceppi batterici produttori, portano ad un sensibile aumento della produzione di poliamine di origine batterica, in particolare putrescina e spermidina, notoriamente conosciute come importantissime fonti energetiche per le cellule gastroenteriche. La presenza di elevate quantita' di queste molecole rappresenta una importante condizione soprattutto per l'animale giovane, ma non solo, dove il tasso di proliferazione e rinnovamento delle cellule intestinali è superiore a quello di ogni altra cellula dell'organismo. Le considerazioni appena descritte ed evidenziate in vitro, dimostrano una reale azione di modulazione dei processi metabolici intestinali a carico della componente batterica, le cui ripercussioni si concretizzano poi su una maggior igiene e sanita' del tratto gastroenterico e quindi un miglior stato di



salute dell'animale.

L'introduzione di batteriocine e/o dei loro ceppi produttori nella dieta, porta ad un miglior assetto morfonazionale della parete intestinale con aumento della superficie epiteliale deputata all'assorbimento dei nutrienti senza intaccarne l'integrità e di conseguenza la funzionalità. Queste considerazioni accoppiate ad un rinnovato e migliorato equilibrio microbico intestinale e le modificazioni metaboliche che ne conseguono, si ripercuotono in un ottimale stato di salute dell'organismo ed una migliore efficienza di utilizzazione dei nutrienti.

L'efficacia dell'invenzione risulta anche dall'interazione delle batteriocine citate con le strutture della mucosa intestinale. Più precisamente, pur non essendo stata correlata ad alcun meccanismo specifico, le batteriocine descritte, quando interodotte con la dieta o prodotte in situ dai rispettivi ceppi batterici produttori, svolgono la loro azione sia nel lume intestinale, sia venendo inglobate nello strato di muco che ricopre le strutture intestinali ed ivi rimanendo attiva svolge un ruolo di protezione contro l'attacco di batteri patogeni, sia umani che animali, impedendone l'attacco alla mucosa e l'azione nociva, con conseguente riduzione della morbilità e dell'insorgenza di turbe gastrointestinali, detimentali per l'organismo. L'inglobamento nel muco intestinale, ne preserva quindi l'integrità funzionale, preservandole dagli attacchi dei processi digestivi.

Un aspetto sorprendente della presente invenzione è la modulazione dell'ambiente gastroenterico, sotto tutti gli aspetti microbiologici, metabolici, igienici, sanitari, e profilattici con miglioramento delle condizioni di salute dell'apparato digerente. L'invenzione, risulta pertanto particolarmente utile quando le batteriocine e/o i loro ceppi produttori sono impiegati come additivo, integratore, supplemento nella dieta per tutte le specie precedentemente citate.

L'uso dell'invenzione comprende altresi' il suo impiego a qualsiasi titolo, nella prevenzione, profilassi, delle patologie da clostridi in qualunque delle specie sopra citate nonche' come supporto a qualsiasi intervento prima, durante e/o susseguenti l'insorgenza di tali patologie.

5 In una realizzazione preferita, la presente invenzione riguarda l'utilizzo innovativo di batteriocine e/o dei loro ceppi produttori come miglioratori delle condizioni del tratto gastro intestinale delle specie di organismi monogastriche. Le batteriocine e/o i ceppi batterici piu' indicati sono *Pedicoccus pentosaceus* FBB61, *Pediococcus pentosaceus* FBB63, *Pediococcus pentosaceus* L 7230 (ATCC 43201), nonche' tutte le batteriocine da loro prodotte e/o molecole analoghe alla pediocina A.

10 Quando ingeriti i microrganismi e/o le loro batteriocine portano ad un miglioramento dell'efficienza alimentare con migliore utilizzazione dei nutrienti ed una migliorata condizione microbiologica, metabolica, igienica, sanitaria attraverso: 1) produzione di acido lattico con diminuzione del pH ed insorgenza di condizioni sfavorevoli per batteri nocivi e/o patogeni, 2) colonizzazione del tratto gastroenterico da parte di batteri benefici a discapito di microrganismi nocivi, 3) spiccata azione antimicrobica delle batteriocine contro batteri Gram +, compresi i Clostridi, detinentali per l'organismo, 4) modulazione del metabolismo con riduzione della produzione di sostanze oncogeniche (cresolo), 15 5) modulazione del metabolismo con aumento della presenza di poliamine (putrescina e spermidina) nel lume intestinale che fungono da importanti fonti energetiche per le strutture gastroenteriche, 6) aumento della superficie assorbitiva intestinale e mantenimento della sua corretta funzionalita', 7) 20 25 adesione delle batteriocine nel muco ricoprente le mucose gastroenteriche con

costituzione di una barriera di protezione contro qualsiasi azione di microrganismi nocivi.

In una realizzazione preferita viene contemplata l'introduzione di piu' batteri produttori di batteriocine e/o le batteriocine stesse in qualsiasi combinazione utile.

L'aggiunta e la miscelazione dei componenti sopra citati puo' avvenire manualmente oppure utilizzando un qualsiasi numero e tipologia di dispositivi adeguati alla produzione di piccole come anche di grandi quantita' di mangime liquido o solido. Se l'alimento non è già particolato in natura, batteri e batteriocine possono essere aggiunti contemporaneamente alla granulazione e/o macinazione e/o polverizzazione dell'alimento stesso. Qualunque metodo ideale alla preparazione del mangime in qualunque sua forma puo' essere utilizzato al fine di associare e rendere possibile l'introduzione dei batteri e/o delle batteriocine nell'alimento, anche attraverso l'utilizzo di agenti leganti, adsorbenti, eccipienti od ogni altro metodo e/o sostanza atta allo scopo.

Similarmente i ceppi batterici produttori di batteriocine e/o le loro batteriocine possono essere aggiunti alla dieta od alle singole materie prime da soli od in qualunque combinazione, in qualunque forma fisica sia essa liofilizzata, liquida, essiccata, pelletata, e chimica sia essa libera o protetta con qualunque metodo adeguato allo scopo.

Vantaggiosamente, le batteriocine sono presenti nell'alimento in quantità compresa nell'intervallo da 1 a 10.000 Unità Attive (AU) per ml e/o gr di alimento. L'invenzione concerne altresì l'utilizzo di batteri produttori di batteriocine somministrate in qualsiasi forma ed in grado di produrre un quantitativo di batteriocina tale da rientrare nell'intervallo precedentemente.

nominato.

Gli esempi che seguono sono da intendersi esclusivamente come aiuto ad una migliore comprensione dell'invenzione. I seguenti esempi non costituiscono alcuna limitazione all'invenzione descritta e/o alle rivendicazioni presentate, ne tantomeno ai campi di applicabilita'.

ESEMPI

Ceppi batterici e condizioni di crescita

Nel corso della ricerca sono stati impiegati: il ceppo *Pediococcus pentosaceus* FBB61 (ATCC 43200), quale produttore della pediocina A e il ceppo *Pediococcus pentosaceus* FBB61-2, mutante isogenetico che non produce la batteriocina e non presenta i caratteri di immunità (Imm-), (Daeschel, e Klaenhammer, 1985), quale ceppo indicatore. Questi due ceppi sono stati coltivati per una notte, in terreno M17 broth (Oxoid Ltd, Dasingstoke, UK) + 1% (w/v) glucosio a 39°C (Sambrook et al., 1989). I terreni agarizzati e quelli usati per i test di overlay, sono stati preparati con l'aggiunta di 1,5% (w/v) agar al terreno liquido.

Produzione della batteriocina

I due ceppi batterici FBB61 e FBB61-2, sono stati incubati in un brodo M17 + 1% (w/v) glucosio a 39°C per 24 ore. Le culture sono state quindi centrifugate a 20 10000 RPM per 15 minuti e il surnatante raccolto e filtrato (Nalgenè Filterware, Nalge Nunc International, NY, USA) attraverso membrane con pori di $\phi=0,45$ μm . In seguito il surnatante filtrato è stato concentrato tramite dialisi contro polietilen-glicole di peso molecolare 20000 Da (PEG 20000, Sigma Chemical, St.Louis, MO, USA). Per questa operazione sono stati impiegati tubi da dialisi con cutt-off di 12000/14000 MW (Spectra/Pro 4, Spectrum, Huston, Texas,



USA). Il processo è avvenuto alla temperatura di 4°C, per la durata di una intera notte. Le due soluzioni in cui i tubi da dialisi sono stati immersi, sono state costantemente agitate mediante uno stirrer, in modo da favorire un migliore flusso osmotico.

5 Purificazione della pediocina A

Il dializzato delle due culture FBB61 (Dia+ = dializzato del ceppo produttore) e FBB61-2 (Dia- = dializzato del ceppo non produttore e sensibile), è stato sottoposto ad ulteriore dialisi contro una soluzione di NaCl 150 mM 20 mM Tris-HCl, sempre ad una temperatura di 4°C, per una notte. Il pH della soluzione ottenuta, è stato successivamente aggiustato a 8,1 tramite l'aggiunta di HCl 33%. La soluzione ottenuta è stata ulteriormente sterilizzata mediante filtrazione attraverso filtri a porosità di 0,45 µm.

La purificazione della pediocina A è avvenuta tramite cromatografia a scambio ionico a bassa pressione.

10 Cinque colonne cromatografiche a scambio ionico da 5 ml ciascuna, sono state montate in serie e collegate tramite tubi in silicone, ad una pompa peristaltica (Minipuls 3, Gilson Italia Srl, Milano, Italia). La colonna così ottenuta è stata preparata facendola attraversare prima da uno start-buffer1 (20 mM Tris-HCl pH 8,2), poi da un regeneration-buffer (20 mM Tris-HCl + 1 M NaCl pH 8,2) ed in 20 seguito da uno start-buffer2 (20 mM Tris-HCl + 150 mM NaCl pH 8,2). Il volume utilizzato per ciascuna soluzione, 5 volte quello totale della colonna, è stato pompato ad una velocità di 5 ml/min.

25 Ogni campione preparato, è stato caricato nella colonna cromatografica alla velocità di 5 ml/min. fino a saturazione della colonna, ed il residuo ottenuto è stato raccolto e congelato. La seguente separazione delle frazioni è stata ottenuta

facendo attraversare la colonna da 3 volumi di soluzioni di NaCl a forza ionica crescente (250 mM, 500 mM, 750 mM, 1M) tamponate a pH 8,1.

Il processo di chromatografia a scambio ionico, si è costantemente svolto all'interno di un apposito refrigeratore in modo da mantenere una temperatura di circa 4°C.

Fermentazioni intestinali *in vitro*

Trattandosi di processi che si svolgono sul contenuto intestinale del grosso intestino dopo la digestione ed assorbimento ileale, occorre simulare tale effetto sull'alimento da impiegare nella fermentazione. L'alimento, costituito da: mais, 38%; orzo, 30%; crusca di frumento, 15%; farina di soia, 12%; farina di aringhe, 2%; vitamine e minerali, 3%, viene preparato mediante predigestione enzimatica articolata in due momenti, secondo la prima parte della metodica di Vervaekte et al., (1989).

1°- Fase di digestione gastrica: 2 g di alimento (particelle $\phi < 1$ mm) in 40 ml di una soluzione 0,075N di HCl allo 0,2% di pepsina (E.C. 3.4.23.1, P7000; Sigma Chemical, St.Louis, MO, USA) vengono incubati a 39°C nel bagnomaria agitato per 4 h.

Portata la soluzione del primo passaggio a pH 7,5 con NaOH 1N, inizia la:

2°- Fase di digestione intestinale: in cui viene aggiunta una egual quantità di tampone, 40 ml ogni 2 g di alimento all'1% di pancreatina (P1500 Sigma Chemical, St.Louis, MO, USA) ed incubate come nel 1° passaggio.

Il tampone è stato ottenuto miscelando:

- 500 ml di una soluzione: 46,5 g Na₂HPO₄ + 49,0 g di NaHCO₃ + 2,35 g di NaCl + 2,85 g di KCl prima sciolti poi portati ad 1 litro con acqua deionizzata,

- 5 ml di una soluzione al 6% di MgCl₂,

- 5 ml di una soluzione al 4% di CaCl_2 .

I 510 ml totali sono poi stati portati, sempre con acqua deionizzata, a 2,5 litri e poi aggiustati a pH 7,5 con HCl 3N (Martillotti et al., 1987).

L'alimento predigerito è ottenuto per centrifugazione a $3000 \times g$ e 4°C , lavato per 3 volte con acqua deionizzata, simulazione dell'assorbimento intestinale, sempre eliminata per centrifugazione.

Il residuo solido accumulatosi sul fondo delle provette dopo centrifugazione, è stato posto in stufa a 55°C , temperatura necessaria per evitare denaturazioni dei principi attivi alimentari, sino ad essiccamiento (circa 24 ore), quindi rimacinato e conservato sigillato in freezer.

Analisi dell'alimento prima e dopo la predigestione

Alimento completo Alimento predigerito

Umidità % 10,77 0,00

Proteina greggia % 17,59 4,19

15 Lipidi greggi % 4,10 1,98

Ceneri gregge % 3,73 2,95

NDF % 14,08 27,23

ADF % 4,97 11,27

Amido % 49,42 50,04

20 Efficienza di estrazione 35-40 %

Preparazione dell'inoculo ciecale ottenuto alla macellazione

1°- Fase del prelievo: subito dopo l'estrazione dell'intestino dalla carcassa, il cieco è legato all'altezza della valvola ileo-ciecale e tagliato. Da un piccolo foro praticato alla testa del cieco, il contenuto viene fatto defluire gentilmente in un

contenitore di nylon da cui viene completamente espulsa l'aria ed immediatamente immerso in acqua a 39°C all'interno di una borsa termica, fino alla fase preparatoria attuata in laboratorio.

2°- Fase in laboratorio: il contenuto ciecale misurato versandolo in un cilindro

5 graduato che, come tutti gli altri contenitori da impiegare a diretto contatto con l'inoculo, è stato tenuto a 39°C prima dell'uso. Noto il volume, viene miscelato con la soluzione tampone in proporzione di 1:2. Il tampone composto da:

NaHCO₃, 49 g; KCl, 2,85 g; CaCl₂ x 6H₂O, 0,395 g; Na₂HPO₄ x 12H₂O, 46,5

g; NaCl, 3,5 g; MgSO₄ x 7H₂O, 0,6 g; sciolti in 5 litri di acqua deionizzata

10 (McDougall, 1948) è stato da noi aggiustato a pH 6,7 con l'aggiunta di HCl 3N.

Questa soluzione è stata mantenuta a 39°C in un bagnomaria, ed insufflata con anidride (CO₂) per 20 min. prima dell'impiego. Il composto è quindi stato filtrato attraverso 8 strati di garze in una beuta che, chiusa con cotone e garza, viene rimessa nel bagnomaria sotto CO₂ per 10 min. Nei contenitori con l'alimento predigerito, riscaldati a 39°C, viene versato il contenuto ciecale appena preparato, dopo aver insufflato sul fondo CO₂ tramite una cannula collegata ad una bombola.

Immediatamente dopo, i vasetti sono chiusi ermeticamente ed immersi in un bagnomaria a 39°C, dove sono rimasti per tutta la durata della fermentazione (48 ore), costantemente agitati.

Schema operativo della fermentazione:

- Tesi 1, Controllo: 20 mg farina + 5 ml inoculo,

- Tesi 2, BAC+: 20 mg alimento predigerito + 5 ml inoculo + pediocina A pari ad una concentrazione finale = 160 AU/ml,

- Tesi 3, BAC-: 20 mg alimento predigerito + 5 ml inoculo + stesse frazioni



dell'eluizione del surmatante do *Pediococcus pentosaceus* FBB61-2 corrispondenti alle frazioni di *Pediococcus pentosaceus* FBB61 contenenti la pediocina A. Il quantitativo aggiunto ha apportato una concentrazione proteica pari a quella introdotta con la pediocina A nella Tesi 2.

5 Analisi chimica degli alimenti e del liquido ciecale

L'analisi centesimale della dieta è stata effettuata secondo le modalità dell'AOAC (1990), e le frazioni fibrose neutro deterse (NDF), acido deterse (ADF) e la lignina (ADL) secondo Van Soest et al., nel 1991. Emicellulose e cellulosa sono state invece calcolate per differenza fra NDF e ADF e ADF e ADL. L'Energia linda è stata valutata mediante bomba calorimetrica (modello 1261; Parr Instrument, Moline, IL, USA).

La determinazione della concentrazione di cresolo nei campioni è avvenuta seguendo il metodo proposto da Birkett et al., 1995.

Dalla sperimentazione è emerso che i campioni raccolti durante le 48 ore di fermentazione, hanno rivelato una riduzione significativa della produzione di cresolo. Già dopo 31 ore di processo fermentativo, la presenza di pediocina A nel trattamento denominato BAC+ (trattamento nel quale è stato utilizzato un ceppo produttore) ha portato ad una riduzione della produzione di cresolo, sostanza oncogenica, (-73.30%; P<0.05) rispetto al trattamento con il mutante isogenetico (BAC-, trattamento nel quale è stato utilizzato un ceppo non produttore e sensibile), mentre dopo 48 ore la riduzione della concentrazione di cresolo si attestava su valori ancora più significativi: -87.65%; P,0.05. L'aggiunta di pediocina A al liquido di fermentazione alla concentrazione finale di 160 AU/ml, ha portato ad produzione di putrescina molto rigogliosa durante le prime 4 ore (+203.40% vs BAC-; P,0.001) per poi stabilizzarsi su queti valori

fino a fine prova. La concentrazione di spermidina dopo l'aggiunta di peidocina A al liquido di fermentazione, si è sempre attestata su valori superiori rispetti al controllo di riferimento (BAC-) anche se dagli alti valori registrati alla 16° ora (37.58 μ mol/L) si è arrivati a valori piu' ridotti a fine prova (8.08 μ mol/L).

5 In TAVOLA 1, Figura A, B e C viene riportato l'effetto della pediocina A sulla produzione di poliamine e di cresolo, quando introdotta nel liquido di fermentazione ad una concentrazione finale di 160 Unità Attive (AU)/ml.

Animali e dieta

La prova in vivo (72 suinetti svezzati, razza seghers) ha monitorato gli effetti di 10 una dieta supplementata con *Pediococcus pentosaceus* FBB61 (BAC+) ceppo produttore della pediocina A, rispetto al controllo negativo BAC- determinato dal ceppo isomutante *Pediococcus pentosaceus* FBB61-2. La dieta base era costituita come descritto in tabella 1 e 2. All'inizio dell'esperimento, della durata di 56 giorni, gli animali (femmine e maschi castrati) presentavano un peso vivo (PV) medio di 7 kg ed un'eta' di 21 giorni. I soggetti, sono stati divisi 15 in 3 gruppi: 1) controllo CTR ricevente una dieta standard, 2) BAC+ ricevente *Pediococcus pentosaceus* FBB61 colturato su terreno M17 (OXOID) (rapporto mangime brodo di coltura 2:1), 3) BAC- ricevente *Pediococcus pentosaceus* FBB61-2 cresciuto nello stesso terreno di coltura, nelle stesse proporzioni. Dal giorno 0 al giorno 35 di prova gli animali sono stati alimentati ad libitum, in seguito sono stati razionati al 9% del peso vivo metabolico. Ai giorni 0, 14, 35, 56 gli animali sono stati pesati singolarmente, e le performance di crescita rilevate cosi' come i parametri di consumo. Lo studio sulle varianze per i parametri di performance, è stato sviluppato secondo il GLM (General Linear 20 Model) usando SAS ver 6.12 (SAS Institute). Il peso vivo iniziale è stato 25

considerato come covarianza per valutare i pesi vivi e gli incrementi giornalieri.

Il modello statistico usato è stato il seguente:

$$Y_{ij} = \mu + \tau_i + \beta_j (x_{ij} - x) + \epsilon_{ij}$$

dove: μ = media generale; τ = effetto animale; β = fattore di correzione per la covariata; x = media delle osservazioni; ϵ = errore.

Dopo 35 giorni di prova 6 animali dai trattamenti BAC+ e BAC- sono stati sacrificati. Per l'analisi dei parametri morfometrici intestinali (spessore della parete di piccolo e grosso intestino, profondità delle cripte, spessore dei villi, lunghezza villi, tunica mucosa, indice mitotico, indice di apoptosi).

Contemporaneamente anche il pancreas è stato prelevato, per lo stesso tipo di analisi di laboratorio. Il giorno successivo, 4 animali per ogni gruppo sono stati selezionati per testarne la funzionalità della mucosa intestinale, tramite prove di assorbimento *in vivo*. Allo scopo sono state usate 2 molecole marker: albumine sieriche bovine (BSA, 500 mg/kg PV) e sidio-fluorescina (Na-f, 9.4 mg/kg PV).

Le molecole sono state disciolte in soluzione fisiologica prima di essere introdotte direttamente in cavità gastrica tramite cateterizzazione. Dopo 0.5, 1, 2, 4, 8 e 24 h dalla somministrazione sono stati eseguiti prelievi di 4 ml di sangue per la successiva analisi.

Dalla sperimentazione eseguita è emerso che il confronto effettuato fra le performance di crescita dei due gruppi riceventi i due ceppi batterici, ha rivelato interessanti aspetti (tabella 3). Già dopo 35 giorni dall'inizio della prova, pur non evidenziandosi disparità di pesi significative, gli animali riceventi *Pediococcus pentosaceus* FBB61 hanno mostrato una migliore utilizzazione degli alimenti come indicato dai valori di efficienza alimentare (FCR), quando paragonati ai loro controlli interni (BAC-) (1.58 BAC+ vs 1.68 BAC-, P=0.09).

Dato che l'efficienza alimentare non differiva durante il primo periodo di indagine (0-14 giorni) la miglior tendenza registrata a 35 giorni, è da attribuirsi ad una migliore FCR durante il periodo dal 14 al 35 giorno: BAC+ -5.6% (P=0.08) vs BAC-.

5 Gli esami istologici hanno evidenziato cripte piu' profonde negli animali appartenenti al gruppo BAC+ rispetto a quelli del gruppo BAC-, sia nell'intestino digiuno prossimale sia in quelli medio, suggerendo in questi distretti un piu' alto tasso di proliferazione cellulare. Contrariamente invece, l'analisi istologica dell'intestino mediale ha rivelato un indice mitotico inferiore
10 negli animali riceventi *Pediococcus pentosaceus* FBB61 (ATCC 43200), rispetti agli animali riceventi *Pediococcus pentosaceus* FBB61-2. Questo dato spiega come la maggior profondita' delle cripte sia dovuta ad una maggior attivita' di secrezione delle cellule ivi presenti, piu' che ad una loro maggior proliferazione. Le misurazioni relative alle strutture villari intestinali hanno mostrato (Tabella 4
15 e 5): 1) una tendenziale maggior lunghezza dei villi nell'intestino digiuno prossimale e medio; 2) un significativo aumento dello spessore dell'orletto a spazzola, costituito dai microvilli all'apice luminale degli enterociti; 3) una tunica mucosa significativamente piu' spessa rispetto agli animali del gruppo BAC-, sia a livello di digiuno prossimale, sia medio; 4) un minor tasso di divisione cellulare a livello di digiuno medio. Quest'ultima osservazione
20 associata al tendenziale maggior spessore dei villi, puo' significare un ridotto turnover cellulare intestinale che pero' non intaccherebbe l'integrita' della mucosa, come mostrato dalle prove di permeabilita' in vivo. L'aumento dello spessore dell'orletto a spazzola degli enterociti, associato ad una tendenziale
25 maggior lunghezza dei villi, prelude ad un aumentata superficie assorbitiva. A

livello cecale, il trattamento con *Pediococcus pentosaceus* FBB61 ha portato ad un ridotto spessore della tunica mucosa, senza intaccare altre strutture, così come invariati sono stati i parametri istologici pancreatici.

Tabella 1: dieta di controllo usata nella prova in vivo. Le diete dei gruppi trattati partendo dalla stessa base, contemplavano l'aggiunta in rapporto 1:2 di brodo colturale contenente *Pediococcus pentosaceus* FBB61 (BAC+) oppure *Pediococcus pentosaceus* FBB61-2 (BAC-).

Ingredienti (g/kg mangime)

1 Mais 327.2

10 Farina di soia 210.0

Olio di soia 20.0

Orzo 70.0

Orzo fioccatto 250.0

Farina di pesce 30.0

15 Siero in polvere 50.0

L-lisina 5.0

DL metionina 1.0

Carbonato di calcio 3.0

Fosfato di calcio 27.0

20 Cloruro di sodio 1.8

Mix mineral vitaminico 5.0

APPORTI (per Kg di mangime)

Proteine 179.4

Grassi 52.9

25 Fibra 47.9



Ceneri 66.2

Amido 418.5

Energia digeribile (MJ) 0.811

Energia netta (MJ) 0.612

5 Apporti del mix minera vitaminico (per Kg di mangime)

Vit. A (UI) 15000

Vit. D3 (UI) 1700

Vit. E. (mg) 35

Fe 200

10 Cu 170

Zn 200

Tabella 2. Profilo aminoacidico della dieta.

% AA Totali % AA Digeribili

Met + Cys 0.73 0.63

15 Lisina 1.37 1.24

Treonina 0.71 0.60

Triptofano 0.23 0.19

In TAVOLA 2, Tabella 3 sono riportate le prestazioni produttive degli animali. I dati sono presentati come medie \pm deviazione standard. (ADG=Aumento medio giornaliero; FCR=Efficienza alimentare)

In TAVOLA 3, Tabella 4 sono riportate le analisi morfometriche effettuate sull'intestino. I dati sono presentati come medie \pm SEM. * P<0.05, ** P<0.01, ***P<0.0001 quando paragonati gli animali dei gruppi BAC+ vs BAC-. MI=Indice Mitotico.

25 In TAVOLA 4, Tabella 5 sono riportate le analisi morfometriche effettuate

sull'intestino ceco e sul pancreas. I dati sono presentati come medie \pm SEM. **
P<0,01, quando paragonati gli animali dei gruppi BAC+ vs BAC-. MI=Indice
Mitotico.

In TAVOLA 4, Figura D è riportato uno studio di pereabilita'. Concentrazione
di Na-f (μ g/ml) nel plasma degli animali campionati. I dati sono presentati come
medie \pm SD.

INTERAZIONI PEDIOCINA STRUTTURE CELLULARI

La coltura del batterio lattico *Pediococcus pentosaceus* FBB61, la produzione
della sua batteriocina pediocina A e la sua purificazione sono avvenute come
precedentemente descritto. La pediocina A purificata, è stata in seguito marcata
usando in sistema "ECL protein biotinylation (Amersham Pharmacia Biotech,
UK) seguendo le istruzioni della casa produttrice. La rilevazione della proteina
marcata è avvenuta usando Streptavidin horseradish peroxidase conjugated
(HRP) per la rilevazione alla Western blot analisi, oppure tramite Streptavidin-
fluorescein isothiocyanate conjugated (FITC) (Sigma Aldrich, USA) per le
osservazioni microscopiche.

Rilevazione della pediocina A sulla mucosa intestinale

Maiali, ratti e topi sono stati sacrificati, gli intestini piccolo e grande sono stati
raccolti ed immediatamente lavati in una soluzione PBS (pH 7.5) fredda. Una
piccola porzione di intestino digiuno è stata invertita, nel ratto e nel topo, in
modo che la mucosa potesse venire perfettamente in contatto con la soluzione
PBS, mentre dall'intestino di suino è stata prelevata un'area di 0.25 cm². Le
porzioni di intestini così ottenute sono poi state immerse per 15 min. in una
soluzione PBS contenente la pediocina A biotinilata (160 AU/ml). In seguito,
per rimuovere la proteina non legata alla mucosa, i tessuti sono stati lavati 2 volte

in PBS freddo. Le porzioni intestinali sono poi state immerse in 2 ml di acqua distillata sterile al fine di rimuovere la proteina marcata. I tessuti sono stati in seguito eliminati. I 2 ml di soluzione sono stati poi liofilizzati e risospesi in 40 μ l per la successiva analisi tramite SDS-PAGE.

5 SDS-PAGE e Western blot

I campioni ottenuti sono stati esaminati tramite SDS-PAGE in accordo con Laemmli (1970): usando uno stacking gel al 3% di acrylamide ed al 12% per il running gel. Dopo l'elettroforesi le proteine isolate dal gel, sono state plottate su un supporto di nitrocellulosa, usando un mini Trans-blot (BIO-RAD). La rilevazione della pediocina A è avvenuta usanto streptavidina-HRP.

10 Interazioni pediocina-muco

Per questa prova sono state utilizzate mucine tipo II di stomaco di suino, sospese in soluzione PBS alla concentrazione di 1 mg/ml. Lo stesso quantitativo (1mg/ml), è stato disciolto ed incubato per 15 min. a 37°C in una soluzione 15 contenente pediocina A (160 AU/ml). I campioni sono poi stati centrifugati a 8000xg per 15 min. ed il pellet ottenuto è stato lavato per 3 volte con soluzione PBS. 3 μ l di Streptavidina-FITC, sono stati aggiunti al pellet, nel frattempo risospeso in 1 ml di soluzione PBS. Dopo altri 15 min di incubazione a temperatura ambiente, i campioni sono stati nuovamente centrifugati ed il pellet 20 lavato per 3 volte con soluzione PBS. Tessuti prelevati dal suino hanno seguito lo stesso iter: un'area di 0.25 cm² sono stati prelevati ed incubati, per 15 min. a temperatura ambiente, in un buffer contenente la pediocina A biotinilata ad una concentrazione di 160 AU/ml. La proteina non legata è stata lavata via tramite 25 lavaggi con soluzioni PBS. I campioni così ottenuti sono stati analizzati usandi un inverted microscope Nikon TMD equipaggiato con FITC filter set Omega



XF100 (Optical-USA). Il controllo negativo utilizzato è rappresentato dai medesimi campioni non incubati in resenza di pediocina. Questo per escludere interazioni dei marcatori con le strutture intestinali, indipendentemente dalla presenza della pediocina A.

5 Microscopia elettronica

Le cellule di *Pediococcus pentosaceus* FBB61-2 (ceppo isomutante non produttore e sensibile all'azione della batteriocina) contenute in 1 ml di coltura fresca, sono state raccolte tramite centrifugazione e risospese in 300 μ l di soluzione PBS, contenente la pediocina A biotinilata alla concentrazione di 160

10 AU/ml. Dopo 2 lavaggi con PBS, è stata aggiunta streptavidina marcata con particelle d'oro (diametro 5nm). Dopo 10 minuti di incubazione, le cellule sono state lavate in PBS. Maiali, ratti e topi sono stati sacrificati, gli intestini piccolo e grande sono stati raccolti ed immediatamente lavati in una soluzione PBS 9Ph 7.5) fredda. Una piccola porzione di intestino digiuno è stata invertita, nel ratto e

15 nel topo, in modo che la mucosa potesse venire perfettamente in contatto con la soluzione PBS, mentre dall'intestino di suino è stata prelevata un'area di 0.25 cm². Le porzioni di intestini così ottenute sono poi state immerse per 15 min. in una soluzione PBS contenente la pediocina A biotinilata (160 AU/ml). In

20 seguito, per rimuovere la proteina non legata alla mucosa, i tessuti sono stati lavati 2 volte in PBS freddo. A questo punto le cellule batteriche ed i tessuti intestinali sono stati preparati per l'analisi al microscopio elettronico (Jeol JEE 1200 EXII, Jeol LTD, Tokyo, Japan, a 80 kV). I tessuti sono stati altresì preparati ed analizzati tramite un microscopio elettronico a scansione Philips XL 30 ESEM.

25 Dalla sperimentazione eseguita è emerso che dalle osservazioni al microscopio a

fluorescenza, appare chiaro che la pediocina A interagisce con il muco. Il controllo negativo, non presenta alcuna fluorescenza, indice che la streptavidina-FITC non rimane legata al muco. La pediocina A recuperata dal muco ha evidenziato di mantenere un'ottima azione antibatterica come mostrato dalla presenza di aloni di inibizione in piaste petri precedentemente insemenzate con il ceppo sensibile *Pediococcus pentosaceus* FBB61-2. Il meccanismo di interazione fra pediocina A e muco non è ancora noto, ma la batteriocina rimane legata anche quando le strutture mucopolisaccaridiche vengono completamente saturate da lectine. Le rilevazioni dell'attacco della proteina ai tessuti intestinali, non ha rivelato nessuno tipo di legame specifico con regioni delimitate dell'intestino. Al contrario, la pediocina A è in grado di legarsi a qualsiasi struttura (grosso o piccolo intestino) indipendentemente dalle 3 specie animali testate (maiale, ratto topo). Un'interazione aspecifica, ma comunque efficace, si rileva anche fra pediocina A ed il ceppo batterico sensibile alla sua azione *Pediococcus pentosaceus* FBB61-2. Già dopo 5 minuti di co-incubazione, molecole di pediocina A si rilevano a ridosso della membrana cellulare del batterio, sia in formazioni che come singole molecole. Le osservazioni al microscopio elettronico ed a scansione, hanno rivelato la presenza di pediocina A marcata con streptavidina-oro. Più in particolare la pediocina A sembra anche in questo caso rimanere intrappolata nel muco che ricopre le strutture gastro-intestinali, fornendo una protezione contro patogeni GRAM+ grazie alla sua mantenuta attività antibatterica.

RIVENDICAZIONI

- 1) Batteriocine e/o loro ceppi batterici produttori per uso come medicamento.
- 2) Batteriocine e/o loro ceppi batterici produttori secondo la rivendicazione 1 in cui la batteriocina è la Pediocina A o molecole analoghe alla Pediocina A per uso come medicamento.
- 3) Batteriocine e/o loro ceppi batterici produttori secondo la rivendicazione 2 in cui il ceppo batterico è *Pediococcus pentosaceus* FBB61 (ATCC 43200) per uso come medicamento.
- 4) Batteriocine e/o loro ceppi batterici produttori secondo la rivendicazione 2 in cui il ceppo batterico è *Pediococcus pentosaceus* FBB63 per uso come medicamento.
- 5) Batteriocine e/o loro ceppi batterici produttori secondo la rivendicazione 2 in cui il ceppo batterico è *Pediococcus pentosaceus* L 7230 (ATCC 43201) per uso come medicamento.
- 15 6) Uso delle Batteriocine e/o loro ceppi batterici produttori secondo una qualsiasi delle rivendicazioni precedenti 1-5 per la preparazione di una composizione mangimistica agrozootecnica o di un medicamento per il trattamento delle sostanze oncogene nel tratto gastroenterico in specie monogastriche.
- 20 7) Uso delle Batteriocine e/o loro ceppi batterici produttori secondo una qualsiasi delle rivendicazioni precedenti 1-5 per la preparazione di una composizione mangimistica agrozootecnica o di un medicamento per il trattamento di prevenzione e profilassi delle patologie da clostridi in specie monogastriche.
- 25 8) Uso delle Batteriocine e/o loro ceppi batterici produttori secondo una

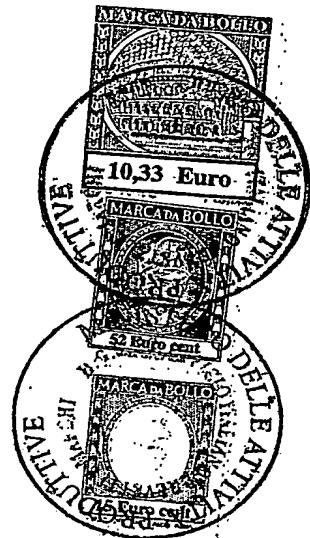
qualsiasi delle rivendicazioni precedenti 1-5 per la preparazione di una composizione mangimistica agrozootecnica o di un medicamento per il trattamento dell'apparato digerente in specie monogastriche.

9) Uso delle Batteriocine e/o loro ceppi batterici produttori secondo una qualsiasi delle rivendicazioni precedenti 1-5 per la preparazione di una composizione mangimistica agrozootecnica o di un medicamento per il trattamento di riduzione della presenza di sostanze oncogene nel tratto gastroenterico, preferibilmente cresolo, in specie monogastriche.

10) Uso secondo una delle rivendicazioni da 6 a 9 in cui le specie monogastriche sono compresi tra: esseri umani, suini, conigli, cavalli, pollame anche selvatico, ovini, caprini, felidi, canidi, ungulati, e ruminanti non funzionali.

RIASSUNTO

La presente invenzione ha per oggetto l'impiego di batteriocine e/o dei loro ceppi produttori per il miglioramento della funzionalità digestiva e per il miglioramento delle condizioni del tratto gastrico intestinale nelle specie di organismi monogastriche.



1/4

SPERMIDINA

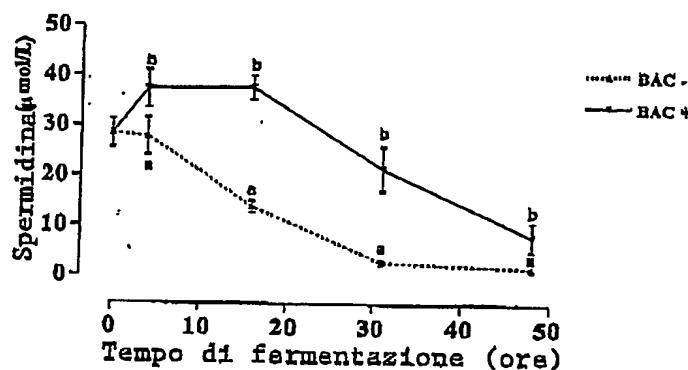


FIGURA A

PUTRESCINA

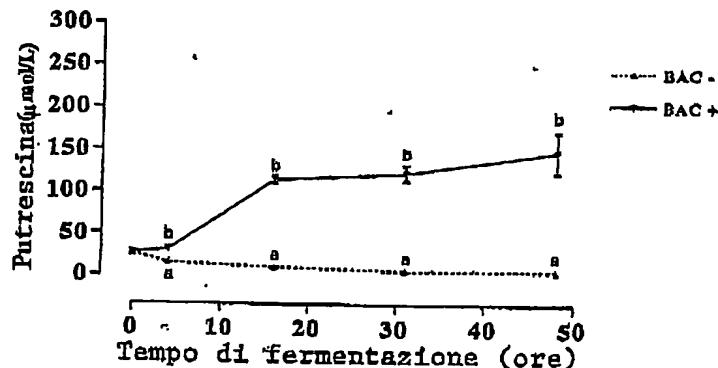


FIGURA B

Effetto della pediocina A sulla produzione di cresolo

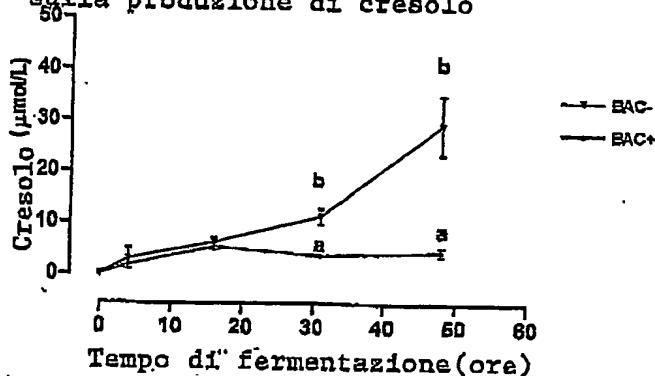


FIGURA C

TAVOLA 1

2/4

TABELLA 3

Tempo (d)		n	Bac+	Bac-
0	Peso	24	7.00±1.20	6.90±1.29
14	Peso	24	9.1±1.42	8.9±1.45
	ADG 0-14	24	155±44	138±49
	Ingestione	6	289±7	290±12
	FCR	6	1.98±0.55	2.18±0.45
35	Peso	24	21.3±2.87	20.5±3.22
	ADG 0-35	24	409±55	387±68
	Ingestione 0-35	6	646±16	644±12
	FCR 0-35	6	1.58±0.05	1.68±0.13
	ADG 14-35	24	578±78	554±92
	Ingestione 14-35	6	884±24	881±24
56	FCR 14-35	6	1.52±0.03	1.61±0.1
	Peso	12	29.3±5.66	28.6±5.4
	ADG 0-56	12	398±33	386±78
	Ingestione 0-56	3	769±22	757±26
	FCR 0-56	3	1.95±0.07	1.96±0.12
	ADG 35-56	12	385±44	418±93
	Ingestione 35-56	3	974±43	944±55
	FCR 35-56	3	2.59±0.12	2.27±0.27

TAVOLA 2

3/4

TABELLA 4

Segmento interstiziale/ Trattamento		Cellule cripte MI [%]	Profondit a' cripte [μ m]	Lunghezza villi [μ m]	Spessore villi [μ m]	Tunica mucosa [μ m]	Apoptosi [%]
Duodeno	Bac-	2.90 \pm 0.30	298 \pm 14	528 \pm 27	138 \pm 2	926 \pm 10	22.60 \pm 2.20
	Bac+	3.10 \pm 0.20	278 \pm 9	567 \pm 43	134 \pm 5	880 \pm 58	24.30 \pm 2.10
Digiuno prossimale	Bac-	3.10 \pm 0.20	209 \pm 6	502 \pm 24	116 \pm 1	754 \pm 22	20.30 \pm 2.90
	Bac+	3.50 \pm 0.30	244 \pm 5**	571 \pm 22	125 \pm 2	859 \pm 24*	21.20 \pm 3.50
Digiuno medio	Bac-	4.70 \pm 0.10	189 \pm 9	498 \pm 12	122 \pm 4	696 \pm 10	25.10 \pm 2.60
	Bac+	3.80 \pm 0.30*	243 \pm 10**	541 \pm 22	122 \pm 2	806 \pm 44*	22.10 \pm 2.40
Digiuno distale	Bac-	2.82 \pm 0.40	193 \pm 9	475 \pm 16	116 \pm 4	671 \pm 20	25.70 \pm 1.90
	Bac+	3.36 \pm 0.60	202 \pm 11	463 \pm 26	130 \pm 8	665 \pm 19	27.20 \pm 3.30
Ileo	Bac-	3.42 \pm 0.40	171 \pm 5	427 \pm 22	117 \pm 5	621 \pm 25	20.60 \pm 1.90
	Bac+	3.48 \pm 0.40	163 \pm 8	390 \pm 26	117 \pm 5	582 \pm 27	24.00 \pm 4.90

TAVOLA 3

4/4

TAVOLA 5

Trattamento	Ceco tunica mucosa [μ m]	Area trasversale acini pancreatici [μ m ²]	#cells/acinus	Cellule cripte MI [%]	Apoptosi [%]
Bac-	481 \pm 10	718 \pm 15	9.40 \pm 0.30	7.00 \pm 1.00	10.10 \pm 1.60
Bac+	395 \pm 7**	769 \pm 42	9.30 \pm 0.20	7.40 \pm 1.20	10.40 \pm 2.80

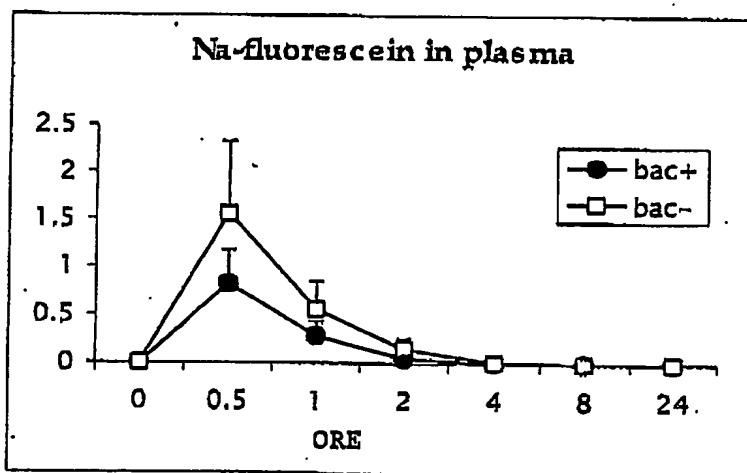


FIGURA D



TAVOLA 4

This Page is inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- BLACK BORDERS
- IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- FADED TEXT OR DRAWING
- BLURED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING
- SKEWED/SLANTED IMAGES
- COLORED OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS
- GRAY SCALE DOCUMENTS
- LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT
- REPERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY
- OTHER: _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.
As rescanning documents *will not* correct images
problems checked, please do not report the
problems to the IFW Image Problem Mailbox